

Cinética de crecimiento de un subrogado de *Escherichia coli* O157:H7 en frutos

Ramírez Zapata, E. L., Delgado Portales, R. E., Moscosa Santillán, M., Loredó Becerra, A., Franco Vega A. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Autónoma de San Luis Potosí. Av. Dr. Manuel Nava # 6, Zona Universitaria, 78210, San Luis Potosí, S. L. P., México. Tel:(444) 826-2440 al 46, Ext. 6546
Correo: elsa.ramirez@uaslp.mx

Palabras clave: Microbiología predictiva, ComBase, vegetales.

Introducción

En los últimos años, las frutas y vegetales han sido reconocidos como vehículos importantes en la transmisión de *Escherichia coli* O157:H7. De acuerdo al Centro de Control y Prevención de Enfermedades de los Estados Unidos, desde el 2006 al 2020, se han reportado 667 casos de personas infectadas con *Escherichia coli* O157:H7, los cuales estuvieron asociados al consumo de productos frescos [1].

Dicha contaminación, puede ocurrir antes y después de la cosecha, siendo posible la contaminación a través de tierra, heces, agua de riego, equipos de procesamiento, manejo humano etc. Además, si la superficie del producto está contaminada, y no se llevan a cabo buenas prácticas de manufactura, dicha contaminación puede ser transportada desde la corteza hasta la parte comestible del fruto durante el proceso de cortado o trituración, lo que proporciona un medio nutritivo, en el que los patógenos pueden sobrevivir o crecer, en especial si no hay un proceso letal o si existe el abuso de temperatura, por lo tanto, la prevención de la contaminación inicial es crucial durante el manejo de frutas y vegetales.

En este sentido, la FDA recomienda la adopción de un sistema de Análisis de Peligros y Puntos de Control Críticos (HACCP, por sus siglas en inglés), debido a que tiene un enfoque proactivo, que busca prevenir la contaminación de los alimentos, en lugar de tratar de identificar y controlar después de que la contaminación haya ocurrido [2]. En estos sistemas, la identificación de los peligros, de los puntos de control críticos y las especificaciones de los límites y las acciones correctivas, se basan en datos científicos que permiten correlacionar cuantitativamente, el comportamiento microbiano con los diferentes parámetros de proceso.

Una disciplina que ha resultado de gran utilidad para obtener dicha información, es la microbiología predictiva, la cual, combina elementos de la microbiología, las matemáticas y la estadística, para desarrollar modelos matemáticos que describan y predigan el comportamiento microbiano en función de diferentes factores como la temperatura, el pH, la actividad de agua, entre otros. Su premisa principal, es que las respuestas de poblaciones microbianas a las condiciones ambientales son reproducibles.

Hoy en día, existen herramientas informáticas disponibles en línea que recopilan la información científica y aplican la microbiología predictiva para crear modelos matemáticos que permiten predecir el crecimiento, la supervivencia o la inactivación de los microorganismos. Una de estas herramientas es ComBase, la cual es capaz de describir y predecir el comportamiento de microorganismos patógenos y deteriorativos bajo una variedad de condiciones relacionadas con los alimentos. Sin embargo, los datos sobre los cuales se crearon dichos modelos matemáticos, fueron obtenidos del cultivo de microorganismos en medios de cultivo puros bajo condiciones controladas que pudieran no reflejar la complejidad de los microorganismos en los alimentos, al no considerar su estructura o la presencia de inhibidores de crecimiento o protectores de calor como ácidos orgánicos, humectantes, etc., lo cual conlleva a que los modelos predictivos proporcionen estimaciones conservadoras del crecimiento de microorganismos de interés, principalmente patógenos. Como lo observado por Szewczuk *et. al.* (2016) [3], quienes compararon el crecimiento de *Listeria monocytogenes* en pepino y calabacín, con los datos generados por ComBase Predictor. En sus resultados señalan que, las tasas de crecimiento observadas a 37°C experimentalmente fueron más altas que las tasas predichas por ComBase, lo cual se podría convertir en una situación peligrosa, al utilizar predicciones inexactas para dicho patógeno.

Debido a lo anterior, el objetivo de este trabajo fue obtener los datos cinéticos del crecimiento de un subrogado de *Escherichia coli* O157:H7 en melón y pepino a diferentes temperaturas y concentraciones celulares iniciales, así como comparar dichos datos con los datos cinéticos de ComBase, bajo las mismas condiciones.

Metodología

En este trabajo, se propuso el uso de *Escherichia coli* ATCC 25922 como un subrogado de *Escherichia coli* O157:H7, debido a que, trabajos previos, señalan que sus parámetros de crecimiento son similares, al no

mostrar diferencias significativas en el tiempo de generación, la máxima densidad poblacional (MDP) y el tiempo de la fase de retardo. Por otra parte, este subrogado ha mostrado similitudes en la carga e hidrofobicidad de la superficie celular, la criotolerancia y las capacidades de adherencia y unión en productos vegetales, con la cepa patogénica *Escherichia coli* O157:H7 (Kim and Harrison, 2009) [4].

Se realizaron curvas de crecimiento de *Escherichia coli* ATCC 25922, en dos tipos de frutas: el melón chino (*Cucumis melo*) y el pepino (*Cucumins sativus*). En cuanto a los factores estudiados para la obtención de dichos modelos, fueron la temperatura de incubación y la concentración celular inicial de *Escherichia coli*. Para la primera, se establecieron como nivel inferior y superior 7 °C y 29 °C, respectivamente, mientras que, para la segunda, fueron 1 log UFC/g y 5 log UFC/g, respectivamente. Debido a que se desconoce si el modelo predictivo será lineal o no, se decidió agregar tres puntos centrales (18 °C y 3 log UFC/g) para realizar pruebas de curvatura, teniendo como resultado un diseño factorial completo 2² más tres puntos centrales con dos réplicas.

Para la preparación del inóculo, se tomó una asada del microorganismo previamente cultivado en agar infusión cerebro – corazón (BHI) (Difco, USA), se llevó a caldo BHI y se incubó a 35 °C por 24 horas. Posteriormente, se determinó la concentración celular inicial en dicho caldo, sembrándolo en placas de agar de eosina azul de metileno (EMB; BIOXON, Becton Dickinson de México, México), utilizando la técnica de siembra de Miles & Misra [5]. Una vez conocida la concentración celular, se realizaron los cálculos pertinentes para diluir hasta la concentración previamente establecida en el diseño de experimentos, utilizando como diluyente agua peptonada al 0.1 % (peptona de caseína, BD Bioxon, México).

Para la preparación de los frutos, los cuales fueron obtenidos en mercados de la localidad y seleccionados libres de golpes, grietas y con un estado de maduración adecuado para su consumo, primero se lavaron con agua de grifo y jabón por cinco minutos, después se desinfectaron en una solución de agua clorada a 200 ppm por 15 minutos, seguido de un secado en ambiente estéril por 10 minutos (Campana de flujo laminar, Logic+ A2, Labconco Corporation, USA). Ambos productos fueron pelados y cortados tanto en ambiente como con utensilios estériles. Para el caso del melón, se cortaron paralelepípedos (3 cm x 3 cm x 1 cm) de 7 ± 1 g y para el pepino se cortaron rodajas (3 cm de diámetro y 1 cm de altura) de 10 ± 1 g. Una vez cortados, se coloraron por separado en cajas Petri de vidrio estériles y se inocularon e incubaron de acuerdo a las condiciones previamente establecidas en el diseño de experimentos.

Para evaluar la calidad sanitaria del proceso de cortado, se realizaron determinaciones basadas en los métodos oficiales para Organismos Mesofílicos Aerobios (NOM-092-SSA1-1994), Organismos Coliformes Totales (NOM-113-SSA1-1994), Mohos y Levaduras (NOM-111-SSA1-1994), *Staphylococcus aureus* y *Salmonella* spp. (NOM-210-SSA1-2014) [6]. Adicionalmente, se determinaron bacterias ácido lácticas en agar Man Rogosa Sharpe (MRS) (Difco, USA) por extensión en superficie, incubando a 35 °C por 48 h en recipiente a vacío (17 inHg). Para las determinaciones anteriormente mencionadas, se siguió el método de dilución y preparación de muestras señalado por la NOM-110-SSA1-1994.

Además de la calidad sanitaria, también se determinó en cada fruta el pH (ph-metter, Orion 3 Star, Thermo Scientific, USA), los sólidos solubles totales (Refractómetro R0020002, Refratec, Varsovia, Polonia) y la actividad de agua (AQUALAB 4TEV, METER Group, Inc. USA).

Para seleccionar los tiempos de muestro en cada curva de crecimiento, se utilizaron como base las curvas de crecimiento arrojadas por ComBase para las condiciones específicas de pH y actividad de agua (Aw) de cada fruto y la concentración celular inicial y la temperatura, planteadas en el diseño de experimentos. Debido a que ComBase no considera el crecimiento de *E. coli* a 7 °C, se decidió muestrear en esta temperatura cada 24 horas durante 7 días.

Para la cuantificación de *Escherichia coli* en los diferentes puntos de las curvas de crecimiento, se utilizó el método de preparación y dilución de muestras señalado por la NOM-110-SSA1-1994, sembrando cada muestra en Agar EMB con la técnica establecida por Miles & Misra e incubando a 35 °C por 18-24 h, considerando como *Escherichia coli* aquellas colonias negras a moradas intensas con brillo verde metálico y cuantificando las placas que presentaron aproximadamente 20 colonias o más sin confluencia en las áreas inoculadas. Cabe mencionar, que cuando la concentración celular era <100 UFC/g, se utilizó la técnica de siembra vertido en placa, ya que la técnica de Miles & Misra [5] no permite la detección de conteos celulares tan bajos.

Adicionalmente, las muestras se sembraron en Placas Rápidas E. coli/Coliformes (3M™ Petrifilm™, México), y se incubaron a 35 °C por 24 horas. Se consideraron como *Escherichia coli*, aquellas colonias color azul a verdeazulado con o sin gas, independientemente del tamaño o la intensidad del color.

Una vez obtenidos los conteos microbianos, se calculó el promedio y con estos valores, se construyeron las curvas de crecimiento para cada combinación de factores en cada alimento-microorganismo, después, estos datos se ajustaron al modelo de Baranyi y Roberts (1994) [7], utilizando DMFit versión 2019 (ComBase online <https://browser.combase.cc/DMFit.aspx>), para obtener las tasas máximas de crecimiento y el tiempo de latencia.

El ajuste de los datos experimentales con el modelo matemático de Baranyi y Roberts (1994), fue evaluado utilizando el coeficiente de determinación (R^2) y el error estándar de ajuste (SE o Fit).

Después de haber obtenido las tasas de crecimiento, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) con un nivel de significancia ($P \leq 0.05$), para conocer el efecto de la temperatura y la concentración inicial del inóculo y, además, se realizó una prueba de curvatura, para saber si la relación entre la respuesta y los factores era lineal o no. Respecto a las muestras sembradas en las placas Petrifilm, se realizaron pruebas de t-student ($P \leq 0.05$) para saber si sus tasas de crecimiento máximo eran iguales estadísticamente a las tasas obtenidas por el otro método de siembra.

Resultados y discusión

En la tabla 1 se muestran los resultados del análisis de la calidad sanitaria del proceso de cortado, en donde se puede apreciar que se obtuvieron conteos inferiores a los límites perceptibles de cada técnica, y que ni el melón ni el pepino tuvieron la presencia de *Escherichia coli* por lo que se puede asegurar que los conteos microbianos obtenidos en este trabajo pertenecen únicamente a *Escherichia coli* ATCC 25922.

Tabla 1. Resultados del análisis de la calidad sanitaria del proceso de cortado en cada fruta

| Análisis | Melón ^a | Pepino ^b |
|---------------------------------|--------------------|---------------------|
| Organismos Mesofílicos Aerobios | <10 UFC/g | <10 UFC/g |
| Organismos Coliformes Totales | <10 UFC/g | <10 UFC/g |
| Mohos y Levaduras | <10 UFC/g | <10 UFC/g |
| Bacterias ácido lácticas | <100 UFC/g | <100 UFC/g |
| <i>S. aureus</i> | <100 UFC/g | <100 UFC/g |
| <i>Salmonella</i> spp. | Ausencia en 25 g | Ausencia en 25 g |

^a Promedio de 11 muestras; ^b Promedio de 7 muestras

En la tabla 2, se pueden observar los resultados de los análisis fisicoquímicos de las frutas, en donde, se puede notar que tanto el melón como el pepino, tienen elevados valores de A_w , ambos superiores a 0.99, valor con el cual es posible el crecimiento de patógenos en alimentos [8]. También, se puede observar que el pepino es más ácido que el melón, con valores de pH de entre 4.5 y 5.5. Estos valores bajos de pH no son una limitante para el crecimiento de *Escherichia coli* ya que, de acuerdo a la FDA [8], el pH mínimo en que puede crecer es de 4.4 Por lo tanto, ambas frutas son potenciales sustratos para el crecimiento del microorganismo estudiado.

Tabla 1. Resultados de los análisis fisicoquímicos de las muestras de frutas

| Análisis | Pulpa de melón ^a | Pulpa de pepino ^b |
|----------|-----------------------------|------------------------------|
| pH | 6.016 ± 0.267 | 4.560 ± 0.105 |
| A_w | 0.991 ± 0.003 | 0.997 ± 0.001 |
| ° Brix | 8.890 ± 2.315 | 3.600 ± 0.894 |

^a Promedio de 11 muestras; ^b Promedio de 7 muestras

En la tabla 3, se muestran los resultados de los parámetros cinéticos obtenidos, y los datos que arroja ComBase. En primera instancia, se puede observar que la mayoría de los datos, se ajustaron al modelo de Baranyi y Roberts (1994) [7], al obtenerse valores de R^2 superiores a 0.90.

En la misma tabla, se puede observar que, de manera general, el crecimiento se vio favorecido en el melón, al tener tasas de crecimiento mayores que en el pepino. Esto se pudiera relacionar con el pH del alimento, ya que el pH del pepino es más ácido, por lo que la permeabilidad celular del microorganismo se pudiera alterar, ya que la membrana se satura con iones de hidrógeno y se limita el paso de cationes esenciales, además, el pH bajo altera la actividad de los sistemas enzimáticos. Por otra parte, el valor de los °Brix, también pudiera ser una de las causas del crecimiento favorecido de *Escherichia coli* en el melón, ya que, los °Brix en las frutas comprenden sus azúcares, ácidos orgánicos, vitaminas, fructanos, proteínas, pigmentos, compuestos fenólicos y minerales, por lo tanto, el melón, al contener casi el doble de °Brix, tiene

| Alimento | Conc. Cel. Inicial (log UFC/g) | Temperatura (°C) | Datos obtenidos experimentalmente | | | | ComBase | |
|----------|--------------------------------|------------------|-----------------------------------|----------|--------------------------|----------------|--------------------------|----------------|
| | | | R ² | SE (fit) | μ (h ⁻¹) | tiempo lag (h) | μ (h ⁻¹) | tiempo lag (h) |
| Melón | 1 | 7 | 0.950 | 0.448 | 0.0342 ± 0.0057 | --- | --- | --- |
| | 5 | 7 | 0.976 | 0.145 | -0.0437 ± 0.0082 | 99.46 ± 6.30 | --- | --- |
| | 1 | 29 | 0.996 | 0.194 | 0.5750 ± 0.0337 | 0.69 ± 0.60 | 0.468 | 2.97 |
| | 5 | 29 | 0.987 | 0.196 | 0.3770 ± 0.0318 | 0.83 ± 0.83 | 0.468 | 2.97 |
| | 3 | 18 | 0.993 | 0.175 | 0.0990 ± 0.0041 | --- | 0.135 | 10.29 |
| Pepino | 1 | 7 | 0.980 | 0.069 | -0.0300 ± 0.0054 | 20.62 ± 5.16 | --- | --- |
| | 5 | 7 | 0.993 | 0.068 | -0.0158 ± 0.0011 | 42.09 ± 6.94 | --- | --- |
| | 1 | 29 | 0.956 | 0.319 | 0.6000 ± 0.0724 | --- | 0.239 | 5.81 |
| | 5 | 29 | 0.946 | 0.198 | 0.2450 ± 0.0348 | --- | 0.239 | 5.81 |
| | 3 | 18 | 0.953 | 0.257 | 0.0626 ± 0.0065 | --- | 0.064 | 21.71 |

mayor cantidad de nutrientes disponibles para el crecimiento celular y el mantenimiento de las funciones metabólicas de *Escherichia coli*.

Tabla 3. Parámetros cinéticos y de ajuste del crecimiento de *Escherichia coli* en melón y pepino

Respecto al comportamiento de *Escherichia coli* a 7°C, se puede observar que solo crece en el melón y con una concentración celular inicial de 1 log UFC/g al tener valores de tasas de crecimiento positivas, y al alcanzar una MDP de 6.56 log UFC/g después de 188 horas de incubación (datos no mostrados). En cambio, el microorganismo no mostró crecimiento en el pepino ni en el melón cuando la concentración celular inicial era alta, en lugar de eso, se encontraron valores de tasas máximas de crecimiento negativos, lo cual, indica la muerte de dicho microorganismo. Por su parte, ComBase no contempla datos de crecimiento de *E. coli* a esta temperatura. En este sentido, los resultados obtenidos demuestran la necesidad de no solo estudiar, también de crear modelos predictivos para el crecimiento de dicho patógeno a temperaturas por debajo de los 10 °C, sobre todo cuando se trabaja con matrices alimentarias.

Respecto al crecimiento de *Escherichia coli* a 18 °C, se puede observar que la tasa de crecimiento máxima fue mayor en el melón que en el pepino. Además, se encontró que en ambas frutas no existe la fase de latencia, mientras que ComBase estima tiempos de 10.2 y 21.7 horas, respectivamente, generando severas discrepancias con los datos observados.

En cuanto al crecimiento de *Escherichia coli* a 29 °C, se encontró que la mayor tasa de crecimiento fue de 0.6 h⁻¹, obtenida en el pepino y con una concentración celular inicial de 1 log UFC/g. Sin embargo, no fue esta condición en la que se encontró la MDP, fue en el melón con alta concentración celular inicial, alcanzándose 9 log UFC/g a las 14 horas de incubación (figura 1). Además, también se encontró que altos valores de MDP se alcanzaron en el mismo sustrato, pero con concentraciones celulares iniciales de 1 log UFC/g, siendo la MDP de 8.7 log UFC/g, y alcanzándose a las 17 horas de incubación. Por su parte, al comparar los datos obtenidos con los reportados por ComBase, se encontró que fueron insuficientes, ya

que ComBase estima tiempos de latencia más prolongados y valores de MDP de 8.7 log UFC/g a las 24 horas de incubación cuando se trata del melón inoculado con 1 log UFC/g e incubado a 29 °C.

Otra discrepancia importante se encontró al comparar las curvas de crecimiento predichas por ComBase para el pepino (figura 1), ya que ComBase predice tiempos de latencia de 5 horas, mientras que en los resultados experimentales no se encontró dicha fase. Estas discrepancias tienen repercusiones importantes cuando se habla de las fluctuaciones de temperatura que sufren los alimentos durante la cadena de distribución.

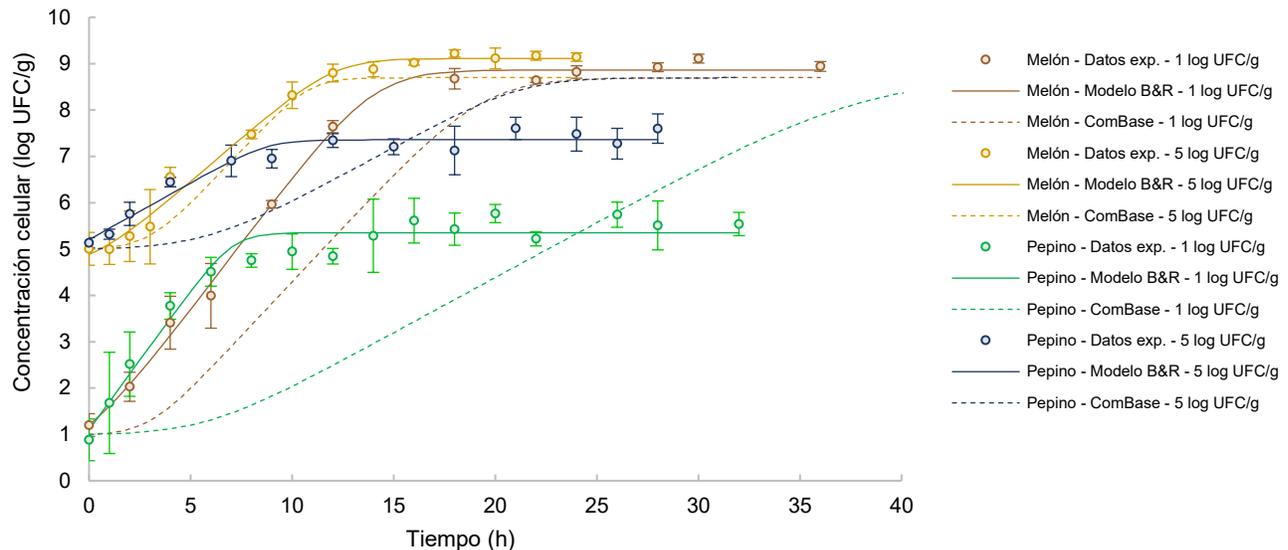


Figura 1. Curvas de crecimiento de *Escherichia coli* ATCC 25922 en pulpas de melón y de pepino a 29 °C. El tipo de alimento y la concentración celular inicial, están diferenciados por colores. Los círculos representan los datos obtenidos experimentalmente (n=6); las líneas continuas representan los datos ajustados al modelo de Baranyi and Roberts (1994) [7]; las líneas punteadas representan las predicciones generadas por ComBase Predictor. Las barras de error representan la desviación estándar.

Respecto al análisis de varianza (ANOVA), se encontró que, para ambas matrices alimentarias, la temperatura, la concentración celular inicial y la interacción de ambas, tienen efecto sobre los valores de las tasas máximas de crecimiento ($P < 0.05$). Además, las pruebas de curvatura para todas las combinaciones alimento-microorganismo de este estudio, resultaron ser estadísticamente significativas ($P < 0.05$), es decir, la tasa de crecimiento máxima no se comporta de manera lineal frente a los factores estudiados, por lo que es necesario, realizar más estudios, para obtener el modelo predictivo que describa adecuadamente el comportamiento de *Escherichia coli* en pulpas de melón y de pepino.

Finalmente, respecto a los resultados obtenidos en las placas Petrifilm, se encontró que mostraron la misma tendencia que los datos experimentales, en ambas matrices alimentarias y en todas las temperaturas y concentraciones celulares probadas, especialmente en las curvas de crecimiento con baja concentración celular (1 log UFC/g), lo que demuestra su buena sensibilidad para la cuantificación de *Escherichia coli*. Por otra parte, los datos experimentales obtenidos mediante la siembra en placas Petrifilm, también se ajustaron adecuadamente al modelo de Baranyi y Roberts (1994) [7], ya que se obtuvieron en todos los casos valores de $R^2 > 0.90$ (datos no mostrados). Además, las tasas máximas de crecimiento obtenidas por el método Petrifilm, no mostraron diferencias significativas con las tasas obtenidas con el otro método de siembra ($P > 0.05$), con lo cual, se sustenta la utilidad y practicidad de las placas 3M™ Petrifilm™ Rapid *E. coli*/Coliform para la obtención de este parámetro cinético de *E. coli* en matrices alimentarias.

Conclusiones

En este estudio, se encontró que *Escherichia coli* es capaz de crecer y sobrevivir en pulpas de melón y pepino, siendo más notorio el crecimiento en el primero. También se demostró, que la temperatura, la concentración celular inicial y su interacción, tienen efecto sobre la tasa máxima de crecimiento, ya que

dicho valor se incrementa cuando el valor de los factores lo hace. Además, de manera general se encontró que ComBase subestimó el crecimiento de *Escherichia coli*, en especial para la fase de latencia. Con estos resultados, se sugiere seguir estudiando el comportamiento de los patógenos en productos frescos frente a diferentes escenarios, con el objetivo de fortalecer los resultados obtenidos y a su vez, enriquecer los datos microbiológicos de ComBase. Esto, a fin de generar predicciones acertadas y confiables, que contribuyan a la inocuidad alimentaria.

Agradecimientos

Los autores agradecen a la empresa 3M por el material proporcionado para la realización de esta investigación (Placas Rapid *E. coli*/Coliform, 3M™ Petrifilm™, México).

Referencias

1. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). 2019. Reports of selected *E. coli* outbreak investigations. Disponible en: <https://www.cdc.gov/ecoli/outbreaks.html> Fecha de Acceso: septiembre 2020.
2. Food and Drug Administration (FDA). 2018. Guidance for industry: guide to minimize microbial food safety hazards of fresh-cut fruits and vegetables. Disponible en: <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/guidance-industry-guide-minimize-microbial-food-safety-hazards-fresh-cut-fruits-and-vegetables#ch1>. Fecha de Acceso: septiembre 2020.
3. Szewczuk, K., Pietracha, D., Zdziennicki, F. and Misiewicz, A. 2016. Comparison of the experimentally obtained growth model of *Listeria monocytogenes* on cucumber and zucchini with existing model generated by ComBase Predictor. *European Food Research Technology*. 242:289-293.
4. Kim, J. K. and Harrison, M. A. 2009. Surrogate selection for *Escherichia coli* O157:H7 based on cryotolerance and attachment to romaine lettuce. *Journal of Food Protection*. 72(7): 1385-1391.
5. Hedges, A. J., Shannon, R., Hobbs, R. P. 1978. Comparison of the precision obtained in counting viable bacteria by the spiral plate maker, the droplette and the Miles & Misra methods. *Journal of Applied Bacteriology*. 45: 57-65.
6. Diario Oficial de la Federación. Catálogo de Normas Oficiales Mexicanas, Secretaria de Salud, Bienes y Servicios. [online]. <https://www.dof.gob.mx/> Consultado: 28 de septiembre de 2020.
7. Baranyi, J. and Roberts T.A. 1994. A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. *International Journal of Food Microbiology*. 23: 277-294.
8. Institute of Food Technologists and Food and Drug Administration (IFT/FDA). 2003. Chapter 3. Factors that influence Microbial Growth. In *Evaluation and Definition of Potentially Hazardous Foods*. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2:21-32.